

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Zaměření: Neurobiologie



Mgr. Pavel Houdek

**Mateřská synchronizace fetálních biologických hodin
na modelu laboratorního potkana**

The Maternal Synchronization of the Fetal Biological Clock in Laboratory Rat

Rigorózní práce

Praha, 2018

Abstrakt

Centrum biologických hodin je v případě potkana i dalších savců uloženo v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN). Neurony těchto jader vykazují cirkadiánně rytmickou aktivitu a časově koordinují fyziologické funkce organismu tak, aby byly vzájemně optimálně načasovány a probíhaly ve správnou denní dobu. Rytmicita těchto neuronů je na molekulární úrovni založena na transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách v expresi tzv. hodinových genů. V průběhu ontogeneze se spontánní rytmicita v SCN graduálně rozvíjí od prenatálního období a je pod přímým vlivem mateřského organismu. Mechanismy jeho působení zkoumají dvě publikace, na nichž je postavena tato rigorózní práce.

První z nich se zabývá tím, od kterého dne prenatálního vývoje začíná být exprese hodinových genů v SCN rytmická. Jsou v ní za fyziologických podmínek porovnány dva 24hodinové profily fetálních SCN dvou různých věků. Ukázalo se, že zatímco v 21. dni embryonálního vývoje jsou již všechny tři sledované hodinové geny (*Bmal1*, *Per2* a *Rev-erba*) exprimovány rytmicky, v 19. dni vývoje je rytmicky přepisován pouze gen *Rev-erba*.

Druhá publikace je zaměřena na vliv mateřského melatoninu na nastavení fáze hodin novorozených potkaních mláďat. V experimentu byly použity březí behaviorálně arytmičné samice vystavené stálému světlu, kterým byla v posledních 5 dnech březosti podávána pravidelná injekce melatoninu, popřípadě vehikula. Následně byl stanoven 24hodinový profil exprese genů *c-Fos* a *Avp* v SCN novorozených mláďat. Porovnání obou skupin ukázalo, že melatonin seřídil rytmy v mláděcích SCN do jiné fáze než vehikulum. Druhý pokus provedený podle stejného schematu na pinealektomovaných samicích potvrdil synchronizující účinek melatoninových injekcí. Vehikulum v tomto případě neseřídilo expresi genu *c-Fos* a jen slabě expresi genu *Avp*. Výsledky obou pokusů ukázaly, že mateřský melatonin hraje roli v synchronizaci fetálních SCN a že jeho účinek sahá až na úroveň genové exprese.

Abstract

In mammals, the central biological clock is located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN). Neurons of the SCN display circadian rhythmic activity and coordinate physiological functions within a day. At the molecular level, the rhythmicity of these neurons is based on transcriptional-translational feedback loops in the expression of so-called clock genes. During ontogenesis, the spontaneous rhythmicity evolves in the SCN gradually from the prenatal period and is affected by the maternal organism signals. The mechanisms of the maternal entrainment were investigated in two publications, which this thesis is based on.

The first publication aimed to determine when the clock gene expression begins to be rhythmic in the SCN during the prenatal development of the laboratory rat. Two 24-hour clock gene expression profiles in the fetal SCN were compared under physiological conditions at two different development stages. The result showed that all three measured clock genes (*Bmal1*, *Per2* and *Rev-erba*) were expressed rhythmically on the 21st day of the embryonic development. However, only the expression of gene *Rev-erba* was found to be rhythmic at the embryonic day 19.

In the second publication, we investigated the effect of the maternal hormone melatonin on the entrainment of the circadian clock in the SCN of newborn rat pups. The pregnant rat dams were exposed to constant light and became behaviorally arrhythmic. During the last five days of gestation, they were injected with either melatonin or vehicle regularly. After delivery, the 24-hour expression profiles of genes *c-Fos* and *Avp* were assessed in SCN of newborn pups. The comparison of both groups demonstrated, that the melatonin injections entrained the pup SCN clock to the different phase than the vehicle injections. The second experiment was performed in pinealectomized rat dams according to the same experimental scheme. The results confirmed the synchronizing effect of melatonin injections. In this case, the vehicle did not entrain the expression of the gene *c-Fos* and only slightly entrained the *Avp* expression. Altogether, the results show that the maternal melatonin plays a role in the synchronization of the fetal SCN and its effect functions at the gene expression level.

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
Seznam použitých zkratek	4
Autorský komentář	
• Co to jsou biologické hodiny	5
• Centrální hodiny jsou uloženy v suprachiasmatických jádrech	6
• Za pravidelnými oscilacemi stojí rytmická genová exprese	7
• Každá buňka těla nese své malé hodiny	7
• Melatonin jako cirkadiánní posel	8
• Hodiny začínají svůj chod už během embryonálního vývoje	9
• Rytmy hodinových genů začínají od Rev-erba	9
• Vyvíjející se embryonální hodiny mají více cest jak přechít vnější čas	13
• Melatonin seřizuje rytmy v expresi fetálních SCN na jinou dobu než vehikulum	13
• Závěr	19
Citované publikace	20
Přílohy	
• In Vivo Initiation of Clock Gene Expression Rhythmicity in Fetal Rat Suprachiasmatic Nuclei	
• Melatonin Administered During the Fetal Stage Affects Circadian Clock in the Suprachiasmatic Nucleus but Not in the Liver	

Seznam použitých zkratek

AVP	arginin-vasopresin
Bmal1	z angl. brain and muscle ARNT-like 1
CCG	z angl. clock-controlled genes, hodinami kontrolované geny,
CLC	z angl. cardiotrophin-like cytokine
Clock	z angl. circadian locomotor output cycles kaput
Cry	z angl. cryptochrome
E14 (En)	14. (n.) den embryonálního vývoje
GABA	z angl. gamma-aminobutyric acid, kyselina γ -aminomáselná
MT1 a MT2	vysokoafinitní melatoninový receptor 1 a 2
Nr1d1	z angl. nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, jinak též Rev-erba
PACAP	z angl. pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAS doména	vazebná doména popsaná na proteinech Per, Arntl a Single-minded
PCR	z angl. polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
Per	z angl. period
PVN	z angl. paraventricular nuclei, paraventrikulární jádra hypotalamu
Rev-Erba	hodinový gen původně nalezen na antisense řetězci kódujícím gen Erba
Rora	z angl. retinoic acid receptor-related orphan receptor α
SCN	z angl. suprachiasmatic nuclei, suprachiasmatická jádra hypotalamu
TGF α	z angl. transforming growth factor alpha
VIP	vasoaktivní intestinální peptid

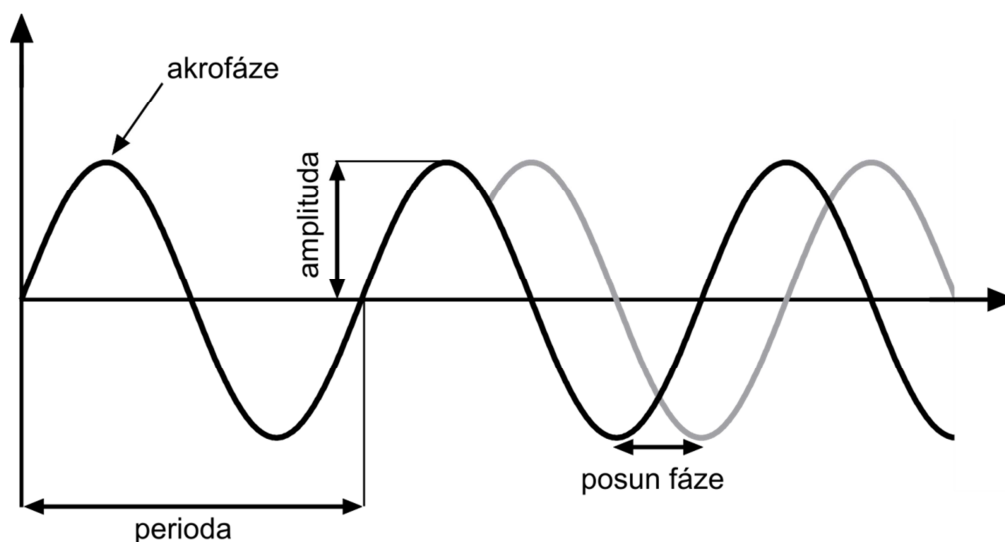
Autorský komentář

Co to jsou biologické hodiny

Biologické hodiny jsou schopnost živých organismů předjímat pravidelné změny v prostředí a připravit se na ně. Jsou pozorovány u všech typů organismů od bakterií přes rostliny po savce, které žijí v periodicky proměnlivém prostředí. Pravidelnost a tedy předvídatelnost změn v životním prostředí spojených se střídáním dne a noci je pro všechny organismy velice důležitá, neboť se tak lze dopředu připravit např. na kolísání okolní teploty, změny v přístupu k potravě, podmínky predace i období spánku. V důsledku toho je i chování organismů v měřítku dnů rytmické a rytmické přetrvává i za zcela neperiodických podmínek (například ve stálé tmě). Proto o biologických hodinách mluvíme jako o vnitřním oscilátoru, tedy endogenní vlastnosti organismu, a nikoliv jako o pasivní reakci na okolní podněty.

Za neperiodických podmínek ovšem běží hodiny s periodou nikoliv přesných, ale pouze přibližných 24 hodin, jde tedy o cirkadiánní rytmy (latinsky circa - přibližně, dies - den). Pokud je tato vnitřní perioda delší než 24 hodin (u potkana typicky 24,2 hod¹), pak organismus za neperiodických podmínek začíná svůj subjektivní den stále později a při tzv. volném běhu v čase se celý jeho cirkadiánní systém opožďuje. Naopak v případě, že je vnitřní perioda kratší než 24 hodin, začíná subjektivní den stále časněji a cirkadiánní systém se předbíhá.

Aby se takové nepřesnosti vyrovnaly a aby se biologické hodiny byly schopné přizpůsobit i změnám délky dne v průběhu roku, seřizuje se cirkadiánní systém řadou korekčních mechanismů, které jej co nejpřesněji synchronizují s aktuálním slunečním časem. Nejsilnějším synchronizačním stimulem je v případě savců světlo dopadající na sítnici, na které hodiny v první polovině noci reagují opožděním a v druhé polovině předběhnutím². Slabší měrou působí na hodiny i stresový stimul³, pohybová aktivita⁴, příjem potravy⁵, sociální interakce⁶, nebo farmakologicky účinné látky⁷. V experimentální praxi pravidelně stojíme před úkolem zjistit, v jaké fázi dne se právě daný cirkadiánní systém nachází. Okamžitý stav biologických hodin lze nejlépe odečíst ze záznamu pohybové aktivity, hladiny hormonů (nejčastěji melatoninu), nebo z míry exprese tzv. hodinových genů.



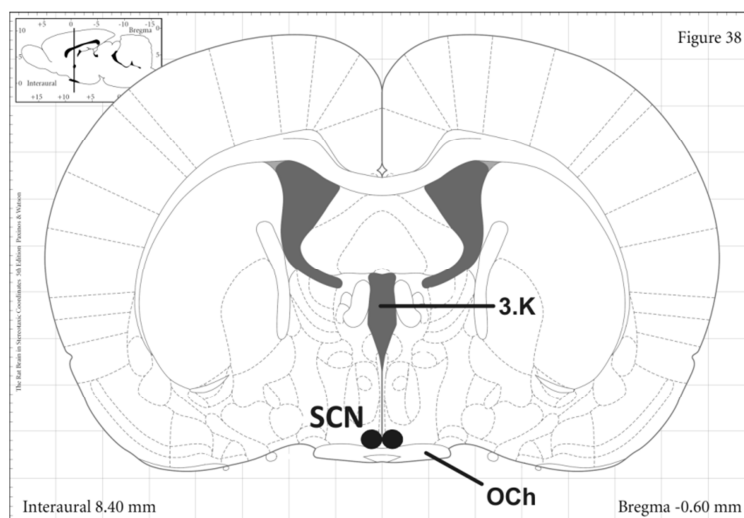
Obr. 1 Znáznornění základních cirkadiánních pojmů na rytmické veličině.

Centrální hodiny jsou uloženy v suprachiasmatických jádrech

Řídícím centrem biologických hodin jsou v případě laboratorního potkana i dalších savců suprachiasmatická jádra (SCN) v hypothalamu⁸. Jedná se o párová jádra uložená při spodině třetí mozkové komory těsně nad křížením zrakových nervů (znázorněno na obr. 2). Neurony těchto jader projevují spontánně rytmickou metabolickou⁹ i elektrickou aktivitu¹⁰ a po jejich lézi vymizí rytmus v chování celého organismu¹¹. Každé z jader lze funkčně i morfologicky rozdělit na ventrolaterální a dorzomediální část. Funkce dorzomediálních SCN spočívá v udržení endogenní rytmicity a pro jejich neurony je charakteristická tvorba neuropřenašeče arginin-vasopresinu¹² (AVP). Ventrolaterální SCN zpracovávají informace o vnějších světelných podmínkách a jejich neurony produkují vasoaktivní intestinální peptid¹³ (VIP). Mimoto je možné mezi neurony SCN identifikovat řadu jiných podskupin na základě exprese určitého neuropeptidu, například somatostatinu¹⁴, gastrin uvolňujícího peptidu¹⁵, kalretininu¹⁶, neurotensinu¹⁷, kyseliny γ -aminomáselné¹⁸ (GABA) a dalších.

Samotná funkce oscilátoru je v SCN umožněna propojením jednotlivých buněk do komplexní neuronální sítě. Na buněčné úrovni totiž každý jeden neuron vykazuje rytmickou elektrickou i transkripční aktivitu o vlastní individuální periodě¹⁹. Teprve vytvořením synaptické sítě mezi těmito nepřesnými buněčnými oscilátory vzniká poměrně přesný oscilátor na úrovni tkáňové²⁰. Synchronizaci tohoto vnitřního oscilátoru s vnějšími podmínkami zajišťují tři hlavní informační vstupy do SCN. Retinohypotalamický trakt přivádí ze sítnice přes zrakový nerv informace o vnějších světelných podmínkách a jeho neuropřenašeči jsou glutamát a PACAP^{21,22}. Genikulohypotalamický trakt přenáší nepřímě světelné i nesvětelné podněty přes intergenikulární lístek talamu a jeho neuropřenašeči jsou neuropeptid Y, GABA a enkefalin^{23,24}. Třetím vstupem je serotonergní dráha z nucleu raphe²⁵.

Zpracovaná časová informace je z SCN rozváděna četnými projekcemi do přilehlých oblastí hypothalamu. Hlavní převodní pákou jsou pro SCN neurony paraventriculárního jádra (PVN), které ovlivňují buďto přímo, nebo přes interneurony v subparaventriculární oblasti²⁶. SCN takto působí jednak na neuroendokrinní buňky PVN a uplatňují tak časovou regulaci například na osu hypothalamus-hypofýza-nadledvinky²⁷, a jednak na preautonomní neurony PVN, od kterých začínají multisynaptické dráhy sympatické i parasympatické inervace²⁸. Další výstupní dráhy jsou známy do mediální preoptické oblasti, dorzomediálních hypothalamických jader, nebo na orexinové neurony v laterálním hypothalamu²⁶. Krom toho také SCN uvolňují do mozkomíšního moku hormony AVP²⁹, TGF α ³⁰, prokineticin 2³¹, nebo CLC³², kterými jsou schopny kontrolovat lokomoční aktivitu.



Obr. 2 Poloha suprachiasmatických jader na frontálním řezu potkaním mozkem. OCh - křížení zrakových nervů, 3.K - třetí mozková komora. Upraveno dle Paxinos a Watson 2005¹³⁴.

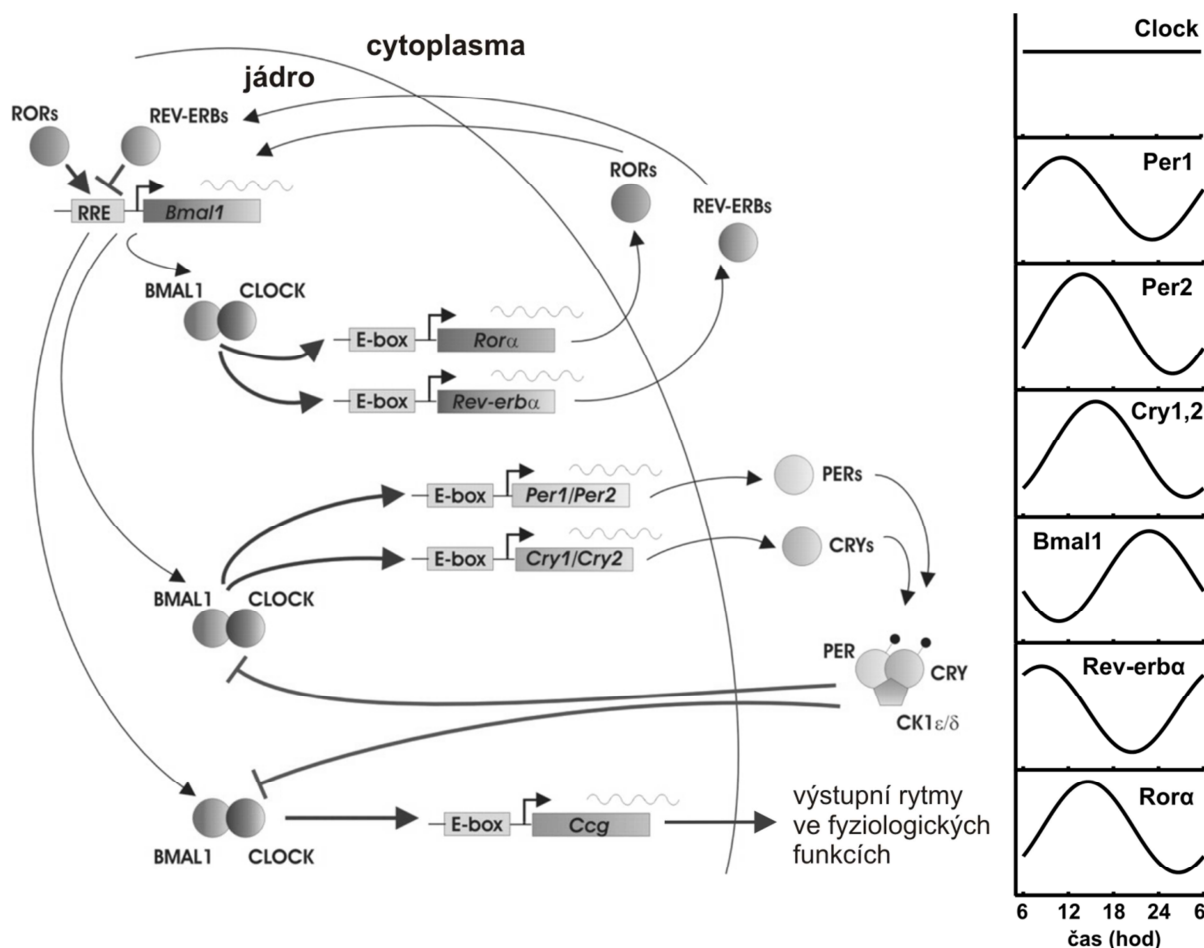
Za pravidelnými oscilacemi stojí rytmická genová exprese

Jak již bylo řečeno, každý neuron suprachiasmatických jader laboratorního potkana je malým autonomním oscilátorem s rytmickou neuronální i metabolickou aktivitou. Na molekulární úrovni vycházejí tyto spontánní rytmické projevy z exprese tzv. hodinových genů, to jest genů, bez nichž by chod hodin nebyl vůbec možný. Patří mezi ně především geny *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rora* a *Rev-erba* (jiným označením *Nr1d1*)^{33,34,35}. Základem samotného hodinového mechanismu jsou dvě transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky genů, které potlačují svoji vlastní expresi (schema molekulárního mechanismu na obr. 3). Na počátku dne se v SCN silně přepisují geny *Bmal1* a *Clock*, přičemž transkripce genu *Clock* je konstantní. Jejich proteiny v cytoplasmě vytvářejí pomocí tzv. basic helix-loop-helix PAS domény heterodimer³⁶ a vstupují zpět do jádra, kde se touto DNA-vazebnou doménou vážou na E-box sekvence DNA a působí jako transkripční faktory³⁷. Takto aktivují transkripci mimojiné hodinových genů *Per* a *Cry*, jejichž exprese tedy v průběhu dne stoupá. Proteiny PER a CRY rovněž vytvářejí v cytoplasmě heterodimery pomocí dimerizační PAS domény a vstupují do buněčného jádra. Tam ovšem působí jako represory transkripce, blokují činnost heterodimerů CLOCK:BMAL1 a inhibují tak svůj další přepis^{38,39}. K večeru tak transkripce genů *Per* a *Cry* vrcholí a během noci opět klesá k rannímu minimu. Kromě genů *Per* a *Cry* indukuje transkripční faktor CLOCK:BMAL1 také přepis genů *Rora* a *Rev-erba*, které tvoří druhou zpětnovazebnou smyčku⁴⁰. Jejich proteinové produkty také fungují jako transkripční faktory a to na RORE sekvenci DNA. Ta se nachází také v promotoru genu *Bmal1* a *Rora* na ni působí pozitivně⁴¹, kdežto *Rev-erba* negativně⁴². V důsledku tak transkripce genu *Bmal1* v první polovině dne prudce klesá a stoupá až v průběhu noci, zatímco exprese genů *Rora* a *Rev-erba* vrcholí v průběhu dne a během noci je na svém minimu. Říkáme tedy, že *Bmal1* je proti ostatním rytmickým hodinovým genům exprimován v protifázi. Tento základní molekulární mechanismus je dále podepřen mnoha dalšími regulacemi, které mu dodávají robustnost a pravidelnost. Patří mezi ně fosforylace hodinových proteinů, jejich ubikvitinace a včasná degradace v proteazomu⁴³, acetylace histonů a remodelace chromatinu⁴⁴, mikroRNA⁴⁵ a další mechanismy, které jsou stále předmětem zkoumání. Důležitým výstupem hodinového mechanismu jsou tzv. hodinami kontrolované geny, jejichž transkripci hodinové geny jakožto transkripční faktory spoluregulují⁴⁶. Přepis hodinami kontrolovaných genů proto bývá rovněž rytmický a pomáhá přenášet časovou informaci k dalším fyziologickým procesům.

Každá buňka těla nese své malé hodiny

Podobně jako neurony SCN představují i buňky periferních orgánů malé buněčné oscilátory, jejichž rytmicita je založena na expresi hodinových genů. Funkční buněčné oscilátory byly nalezeny například v buňkách jater, plic, svalů⁴⁷, nebo třeba hipokampu⁴⁸. Narozdíl od oscilátoru centrálního však periferní tkáňové oscilátory nedokáží samy rytmické oscilace udržet a po vynětí z organismu⁴⁹ nebo po lézi SCN⁵⁰ se jednotlivé buňky mezi sebou desynchronizují a rytmus přestane být navenek patrný. Úkolem centrálního oscilátoru v SCN tedy je synchronizovat jednotlivé buněčné oscilátory na úrovni tkáně i jednotlivé orgány mezi sebou, čehož dosahuje kombinací neuronálního a hormonálního působení, jak bylo popsáno výše. Obvykle bývá u periferních orgánů pozorováno fázové zpoždění 3-9 hodin za SCN⁴⁶. Hodiny v některých orgánech mohou při své synchronizaci podléhat také vlivům tělesné teploty⁵¹, anebo načasování příjmu potravy - například játra, nebo trávicí soustava⁵². Za optimálních fyziologických podmínek tedy všechny buňky určitého orgánu sladí svou činnost na stejný čas, společným přepisem hodinami kontrolovaných genů synchronizují své fyziologické funkce a touto synergií dosahují vyššího společného efektu. Uvádí se, že přepis až

10 % mRNA je načasován vlivem regulace SCN^{53,54}. Oproti tomu při disorchestraci cirkadiálního systému, u člověka například vlivem pásmové nemoci nebo směnného provozu, dochází k vzájemnému nesouladu uvnitř orgánů i mezi orgánovými soustavami, což kromě únavy a osobního nepohodlí může v dlouhodobém měřítku vést i k rozvoji závažných onemocnění (spánkové poruchy, metabolický syndrom, zhoršení průběhu nádorového bujení)^{55,56,57}.



Obr. 3 Schema molekulárního mechanismu vzniku cirkadiálních oscilací dle Ko a Takahashi 2006¹³⁵ doplněné o symbolické znázornění fázových vztahů expresí hodinových genů v SCN. Zkratka Ccg značí hodinami kontrolované geny (angl. clock-controlled genes).

Melatonin jako cirkadiální posel

Jedním z důležitých signalizačních hormonů cirkadiálního systému je melatonin. Je syntetizován v mozku v šišince z prekursoru serotoninu dvěma klíčovými enzymy arylalkylamin-N-acetyltransferázou a hydroxyindol-O-metyltransferázou a následně secernován do krve⁵⁸. Zatímco je hladina melatoninu v průběhu dne nedetekovatelná, během noci prudce stoupá a na osvětlení sítnice reaguje náhlým poklesem⁵⁹. Stává se tak pro organismus signálem tmy a v průběhu roku dokonce měřítkem délky dne. Načasování jeho sekrece i světelná inhibice jsou řízeny drahou, která vede z SCN přes PVN do míšních pregangliových sympatických neuronů a odtud do gglion cervicale superior⁶⁰, které noradrenergně řídí syntézu a výlev melatoninu v šišince^{61,62}. Cirkadiální melatoninový signál je v organismu rozpoznáván dvěma typy vysokoafinitních membránových receptorů MT1 a MT2, které jsou spřažené s G-proteiny^{63,64}. Tyto receptory jsou v organismu rozptýleny

v mnoha typech tkání, včetně jater⁶⁵, srdce⁶⁶, vaječníků⁶⁷, varlat⁶⁸, nadlečin⁶⁹, bílých krvinek⁷⁰, nebo mozku, kde je najdeme i v SCN⁷¹, PVN⁷², pars tuberalis adenohypofýzy⁷³, nebo v hipokampu⁷⁴. Mechanismus účinku aktivovaných receptorů se dosti liší podle typu tkáně, obvykle však zahrnuje utlumení činnosti adenylycyklázy a pokles hladiny cAMP⁷⁵, deaktivaci proteinkinázy A⁷⁶ a posílení aktivity fosfolipázy C⁷⁷. Farmakologické působení melatoninu přímo zpět na centrální oscilátor v SCN je sice možné⁷⁸, ale za fyziologických podmínek k němu nedochází, protože funkčnost melatoninových receptorů je zde omezena pouze na pozdní odpoledne, tedy na dobu před začátkem melatoninové signalizace⁷⁹. Pokud přesto zvnější melatoninový signál před stmíváním podáme, neurony v SCN zareagují okamžitým utlumením aktivity⁷¹ a změnou v expresi genů *Rorb* a *Rev-erba*⁸⁰, což potom naznačí vede k předběhnutí celého hodinového mechanismu. Tohoto efektu lze s výhodou využít při léčbě některých cirkadiálních spánkových poruch⁸¹ anebo v případě slepců neschopných synchronizace s většinovou společností⁸².

Hodiny začínají svůj chod už během embryonálního vývoje

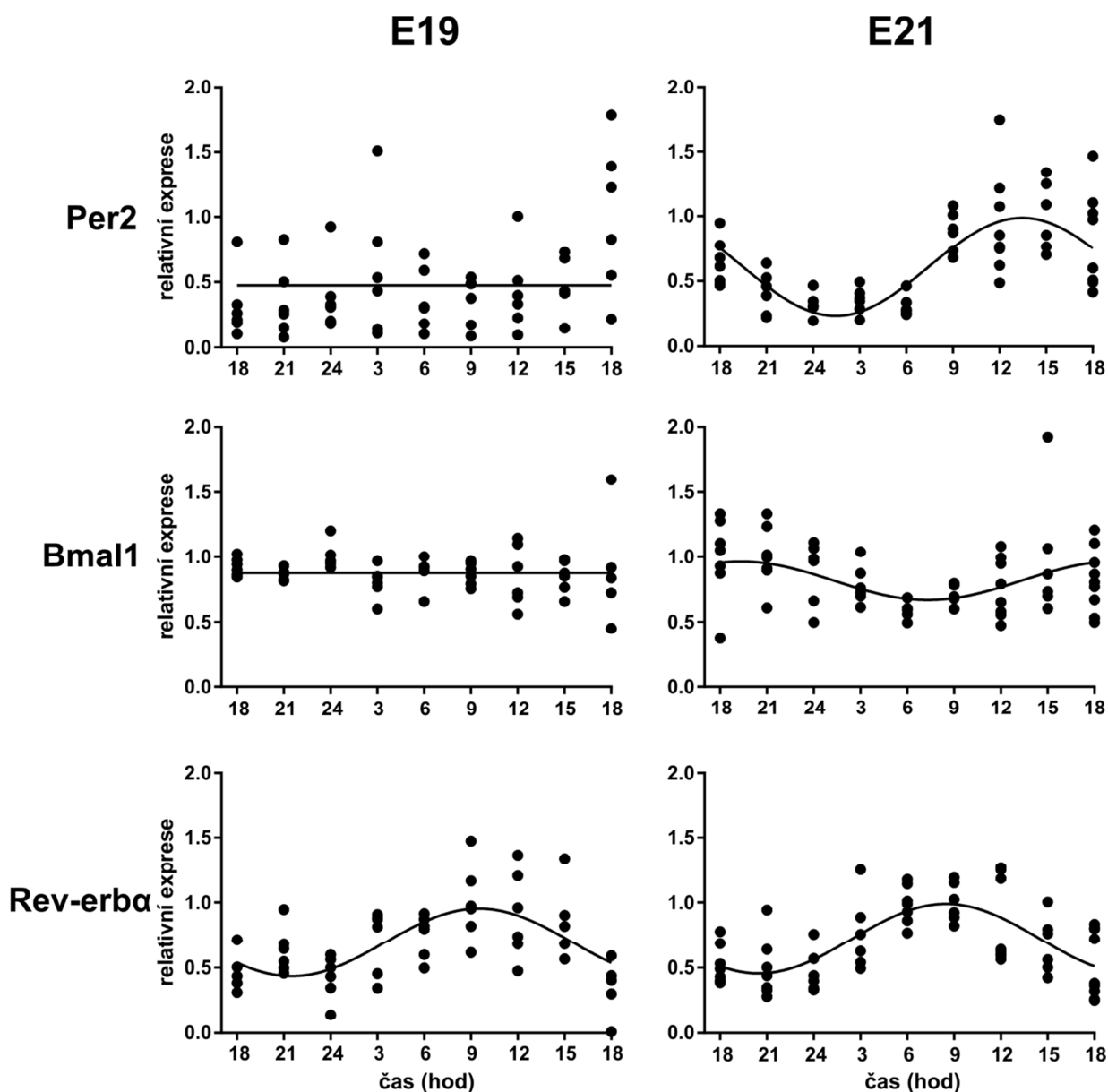
Novorozená mláďata laboratorního potkana přicházejí na svět po 22 dnech nitroděložního vývoje slepá, holá a odkázaná na péči matky, přesto u nich lze pozorovat cirkadiální rytmicitu. Brzy po porodu lze v jejich SCN zachytit rytmickou expresi hodinových genů⁸³, jejíž fáze je od narození nastavena matkou⁸⁴, nicméně samostatné behaviorální projevy řízené mláďecími SCN byly pozorovány až desátého dne života⁸⁵ a většina autorů považuje za skutečně autonomní až rytmy v chování mláďat po odstavu ve čtvrtém týdnu života⁸⁶. Při pátrání po ontogenetických počátcích rytmických jevů vývojové studie ukázaly, že se neurony SCN zakládají kolem 14. dne embryonálního vývoje (E14) a v E17 jsou již všechny buňky utvořeny⁸⁷. Vývoj buněk však pokračuje dále a hustá synaptická síť se dotváří až prvních deset dní po porodu⁸⁷. Teprve s jejím ustavením vzniká plnohodnotný buněčný oscilátor, který je schopen udržet vnitřní rytmicitu⁸⁸, prohlubuje robustnost cirkadiálních oscilací⁸⁹, nebo například vrátuje citlivost ke světlu⁹⁰. Počínaje věkem E19 je zachycena první rytmická aktivita fetálního SCN, a sice ve spotřebě glukózy, která je vyšší ve dne nežli v noci⁹¹. V E22, těsně před porodem, byl také ve starší literatuře zaznamenán rytmus v neuronální aktivitě SCN⁹². Novější literatura se věnuje zkoumání embryonálních rytmů z hlediska genové exprese a nachází první rozdíly mezi dnem a nocí v případě hodinami kontrolovaného genu *Avp* již v E21⁹³. V tom, kdy přesně začíná být exprese hodinových genů v SCN rytmická a rozbíhá se tedy vlastní rodící se hodinový mechanismus, se však literatura rozchází. Jedna autorská skupina nenalezla rytmus v expresi genů *Per1* ani *Per2* dříve než druhého dne po porodu a u genů *Cry1* a *Bmal1* ještě o den později⁸³. Jiná skupina autorů změřila rytmickou expresi *Per1* i *Per2* již v E20⁹⁴. Obě skupiny při měření postupovaly metodou hybridizace *in situ* a proto se otvírala možnost prověřit počátky rytmické exprese novější a přesnější metodou laserové mikrodisekce a následné kvantitativní PCR, kterou jsme využili v publikaci *In Vivo Initiation of Clock Gene Expression Rhythmicity in Fetal Rat Suprachiasmatic Nuclei*.

Rytmy hodinových genů začínají od Rev-erba

Pro bližší vhled do přirozeného vývoje embryonálního hodinového mechanismu laboratorního potkana jsme připravili dva 24hodinové embryonální profily, jeden pro věk E19 a druhý pro E21, tedy těsně před porodem. To znamená, že jsme ze skupiny březích samic ve stejném stadiu gestace po dobu 24 hodin každé 3 hodiny odebrali jednu a hlavičky jejích embryí uchovali zmrazené pro pozdější zpracování. Z fetálních mozků jsme připravili tkáňové řezy, z nichž byla pomocí laserového mikrodisektoru vypreparována samotná SCN a z těch

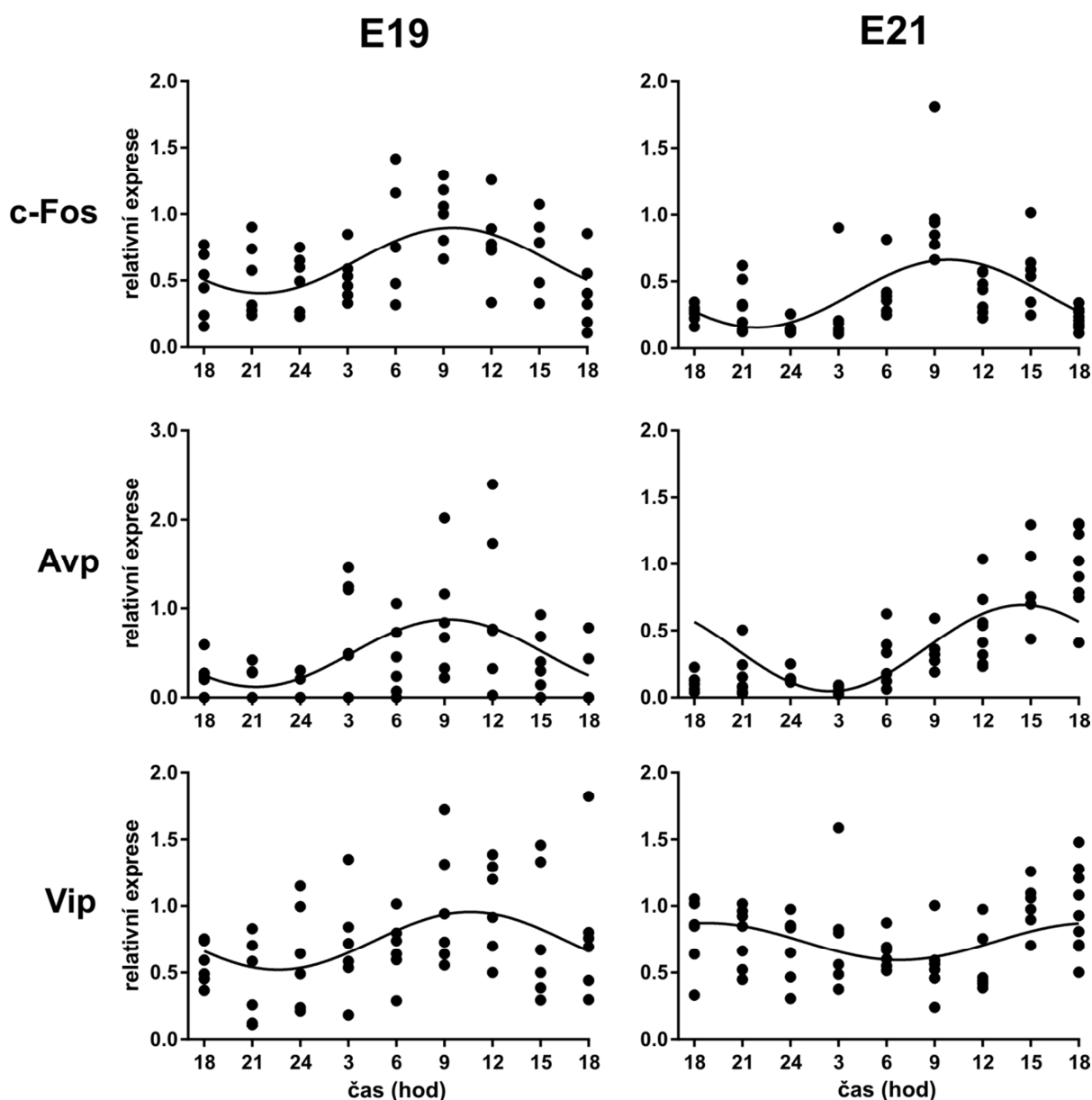
dále pomocí komerčního kitu vyizolována RNA. Následná reverzní transkripce a kvantitativní PCR nám pak umožnily sledovat změny v expresi vybraných genů v průběhu daného 24hodinového profilu. Získaná data jsme podrobili kosinorové analýze, která statisticky rozhoduje, zda lze naměřenými hodnotami lépe proložit vodorovnou přímkou (absence rytmu), nebo sinusovou křivku (model rytmu).

Z výsledků našeho pokusu, jak může čtenář nahlédnout na obr. 4, jednoznačně vyplývá, že ve věku E19 embryonální hodiny v SCN dosud neběží. Hodinové geny *Per2* i *Bmal1* jsou sice transkribovány, ale bez rytmu v jejich expresi není ani rytmické potlačení exprese dalších genů a tudíž nelze mluvit o funkčním hodinovém mechanismu. Pozoruhodný je však rytmus v expresi genu *Rev-erba*, který je takto hodinovým genem, jehož rytmická exprese se objevuje jako první a to dokonce ve fázové shodě s dospělými potkany. Víme sice, že se funkční embryonální hodiny přirozeně vyvinou i v případě arytmiických matek⁹⁵, ale pokud je mateřský



Obr. 4 Exprese hodinových genů *Per2*, *Bmal1* a *Rev-erba* v SCN potkaních 19- a 21denních embryí v průběhu 24 hodin od 18 hodin večer do 18 hodin následujícího dne. Kosinorová analýza prokázala signifikantní rytmus v expresi genu *Rev-erba* v obou věcích a v expresi genů *Per2* a *Bmal1* pouze ve věku E21.

oscilátor funkční, seřídí fetální hodiny do souladu s vlastní fází⁹⁶. Nabízí se tedy domněnka, že by exprese *Rev-erba* mohla být časově řízena mateřským organismem a předávat tak informaci o vnějším čase přímo do počátku embryonálních oscilací. Možných prostředků si k tomu můžeme představit více: jednak bylo v promotoru tohoto genu nalezeno více responzivních elementů, skrze které by mohla být jeho transkripce posílena^{97,98}, a jednak sám bílkovinný produkt REV-ERBa je známým sirotčím receptorem, u něhož byla prokázána vazba hemu⁹⁹, nebo například oxidu uhelnatého¹⁰⁰, který by tak také mohl sloužit coby signální molekula. Další zajímavou vlastností tohoto proteinu je, že se dokáže vázat na promotor svého vlastního genu a teoreticky tak potlačit svoji vlastní expresi¹⁰¹. Je proto dokonce představitelné, že prvotní oscilace exprese tohoto genu vznikají *per se*¹⁰² a mateřským oscilátorem jsou pouze fázově usměrňovány.

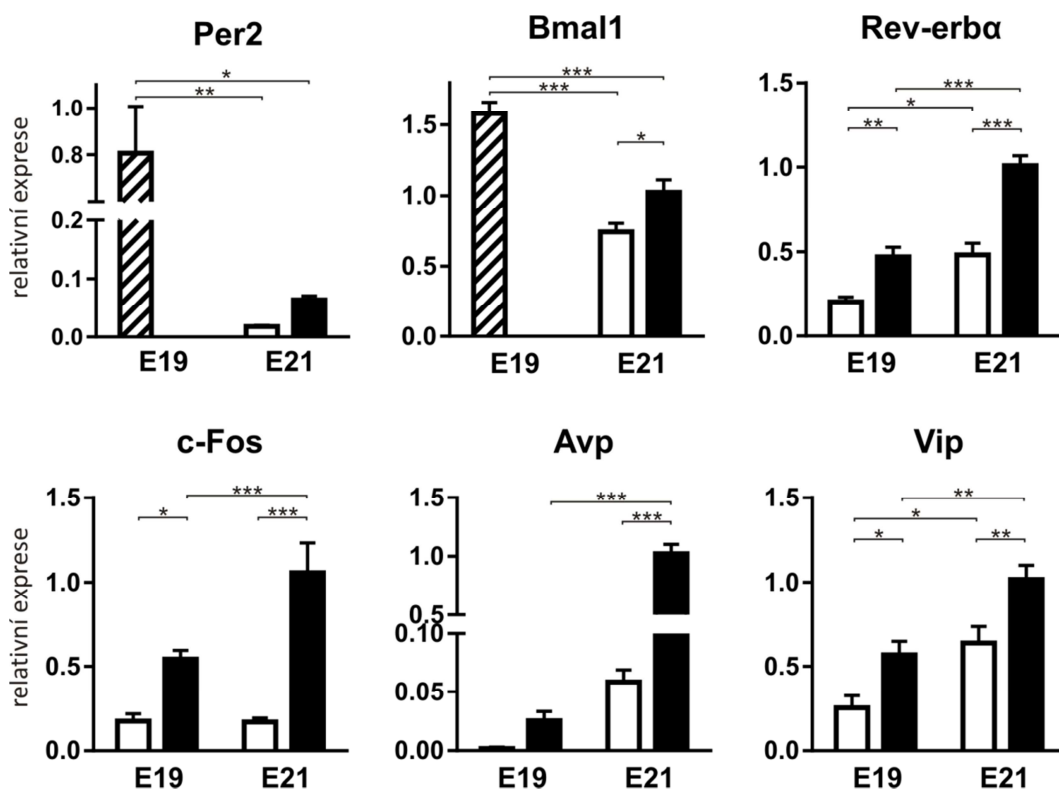


Obr. 5 Exprese hodinami kontrolovaných genů c-Fos, Avp a Vip v SCN potkaních 19- a 21denních embryí v průběhu 24 hodin od 18 hodin večer do 18 hodin následujícího dne. Kosinorová analýza prokázala signifikantní rytmus v expresi všech genů. V případě genů Avp a Vip došlo mezi věky E19 a E21 k signifikantnímu posunu fáze.

Dalším pozorováním z profilu E19 je, že všechny tři zkoumané hodinami řízené geny (*c-Fos*, *Avp* i *Vip*, jak je možno vidět na obr. 5) jsou již v této fázi vývoje v SCN rytmicky exprimovány. Není to přímo překvapivé, neboť funkce těchto genů úzce souvisí s neuronální aktivitou buněk fetálních SCN, která je již v tomto věku měřitelná⁹². Z výše popsaného však vyplývá, že jejich rytmicita nemůže být řízena embryonálními hodinami samými, ale pravděpodobně nějakou cestou mateřským oscilátorem. U genů *c-Fos* i *Avp* je známo, že jejich transkripce může být posílena fosforylovaným proteinem CREB skrze CRE elementy v jejich promotorech^{103,104}, a i jejich shodná fáze by nasvědčovala tomu, že by mohlo jít o tento způsob regulace. V případě *Vip* je zajímavé, že jeho receptory, které jsou ve vyvíjejícím se mozku přítomné¹⁰⁵, dokáží v suprachiasmatických neuronech dospělého jedince právě fosforylaci CREBu spustit^{106,107}, což by naznačovalo další možné spojení.

Konečně ve věkovém profilu E21 již zřetelně rytmuji všechny tři sledované hodinové geny. Dokonce jejich vzájemné fáze jsou nastaveny stejně jako u dospělého jedince. Máme tedy v rukou jednoznačný doklad toho, že v okamžiku porodu, který by byl následoval pouhých několik hodin po posledním bodu tohoto časového profilu, přicházejí na svět mláďata s fungujícími hodinami, jejichž geny jsou rytmicky exprimovány i v náležitém fázovém vztahu. A je možné, že už v tomto stádiu vývoje embryonální hodiny začínají promlouvat do exprese dalších genů, poněvadž právě tak by se dal eventuálně vysvětlit časový posun mezi oběma profily v expresi genu *Avp*, jehož transkripci mohou hodinové geny ovlivnit pomocí E-boxu předřazenému jeho genové sekvenci¹⁰⁸.

Poslední analýzou jsme srovnali úroveň exprese jednotlivých genů mezi oběma profily (obr. 6). Na tom, která signifikantně narostla hladina exprese genů rytmických již v E19, můžeme pozorovat postupný rozvoj rytmicity embryonálních hodin. Zajímavé je, že u genů v E19 nerytmických hladina exprese do E21 prudce poklesla, což by bylo možné vysvětlit všeobecně spíše supresivní povahou regulace exprese hodinových genů⁴⁶.



Obr. 6 Srovnání hladiny exprese jednotlivých genů mezi nejvyššími (černé sloupce) a nejnižšími (bílé sloupce) denními hodnotami a mezi věky E19 a E21. U nerytmických genů je použit průměr dvou bodů (šrafované sloupce). Signifikantní rozdíly vyznačeny hvězdičkami.

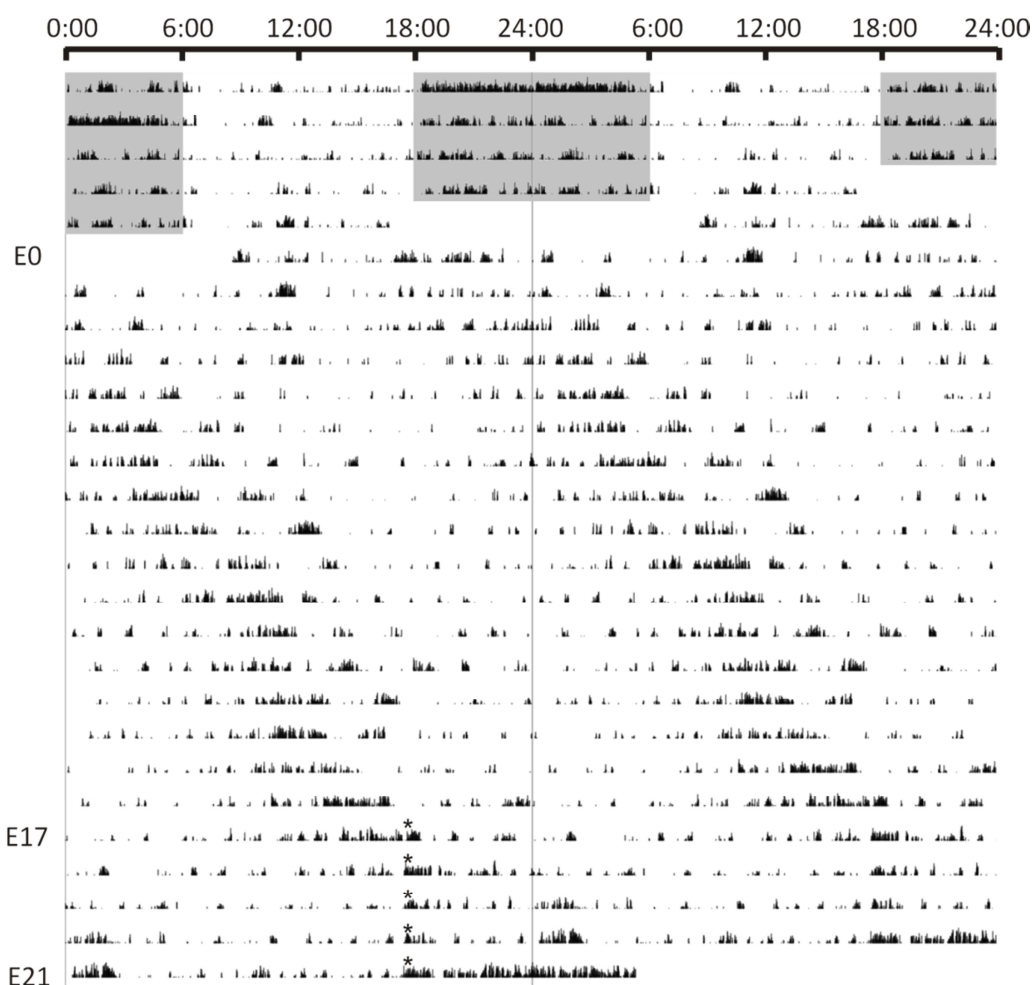
Vyvíjející se embryonální hodiny mají více cest jak přechít vnější čas

Embryonální hodiny tedy začínají svůj chod ještě v lůně matky a jejich fáze je nastavena ve shodě s ní. Jelikož je cirkadiánní rytmicitata ve fetálních SCN předprogramována geneticky, vyvinou se funkční mláděcí oscilátory i v péči matky, která sama má SCN odstraněna^{109,110}. Její potomci však budou mezi sebou vzájemně desynchronizováni, protože mateřské nastavení fáze v tomto případě schází¹¹¹. Dlouhá desetiletí již trvá zájem vědců o to, jakými signály matka své plody o vnějším čase informuje. Byl například zjištěn významný podíl mateřského chování, potažmo načasování příjmu potravy. Chování dospělých potkanů po lézi SCN bývá arytmičné v rychlém střídání klidu a aktivity, když však experimentátoři umožnili březím samicím s odstraněnými SCN přístup k potravě jen ve vymezené části dne, jejich chování se tím opět rytmizovalo a jejich mláďata opět nabyla vzájemné synchronicity¹¹². Podobně se na březích samicích křečka zlatého bez funkčních SCN testoval vliv dopaminu a ukázalo se, že i jediná dávka tohoto hormonu stačila synchronizovat mláďata ve vrhu, konkrétně jejich pohybovou aktivitu ve věku 20 dnů¹¹³. Nejčastěji zkoumanou signální molekulou však je melatonin, jehož rytmický noční výlev k tomu přímo vybízí. Krom toho melatonin dobře prostupuje přes placentu¹¹⁴ i hematoencefalickou bariéru¹¹⁵ a v embryonálních SCN byla prokázána přítomnost jeho receptorů¹¹⁶ i vazba od věku E18¹¹⁷. Experimenty zkoumající, zda se fetální SCN jsou schopna synchronizovat i bez přítomnosti mateřského melatoninu, se ve svých výsledcích bohužel rozcházejí^{118,119}. Slabinou těchto prací je, že původní fázi fetálních hodin odvozují až z druhotných ukazatelů u mláďat ve věku 10 nebo 20 dnů věku, kdy původní stav synchronicity vrhu už mohl být překryt dalšími vlivy. Přesvědčivější výsledky přinášejí pokusy, v nichž se stav hrozící desynchronizace mláďat ve vrhu podařilo zvrátit pomocí aplikace melatoninu^{119,120}. Zejména v elegantním pokusu provedeném na březích samicích křečka zlatého, kterým bylo odstraněno SCN a byly drženy v konstantních podmínkách, byl prokázán synchronizační efekt melatoninu na hodiny jejich embryí. Březí samice dostávaly po 8 dní před porodem dvě injekce denně v rozestupu 12 hodin, z nichž pouze jedna (buď polední, nebo půlnoční) obsahovala kromě vehikula i melatonin. Po odstavu ve 20 dnech věku byla proměřena pohybová aktivita jejich mláďat a ukázalo se, že vrhy jsou skutečně synchronizovány a to v protifázi vůči sobě podle doby podání melatoninu¹²¹. Podobného schematu podávání melatoninu využil další pokus, ve kterém byla dospělým křečkům transplantována fetální SCN namísto jejich odstraněných. Opět se prokázalo, že fetální SCN, která byla s to řídit pohybovou aktivitu dospělých jedinců, synchronizovala svou fázi dle melatoninových a nikoliv vehikulových injekcí¹²². Toto pozorování nám tedy přináší informaci o přímé reakci embryonálních SCN na podání melatoninu, zatímco předchozí pokusy usuzovaly na jejich fázi pouze zprostředkovaně po uplynutí doby nutné k odchovu a odstavu mláďat. Bezprostřední vzhled do změn ve fetálních SCN na úrovni genové exprese však podán nebyl a to se stalo předmětem naší práce *Melatonin Administered During the Fetal Stage Affects Circadian Clock in the Suprachiasmatic Nucleus but Not in the Liver*.

Melatonin seřizuje rytmy v expresi fetálních SCN na jinou dobu než vehikulum

V tomto pokusu jsme se rozhodli prověřit účinek melatoninu pravidelně podávaného posledních 5 dní před porodem na expresi dvou hodinami kontrolovaných genů (*c-Fos* a *Avp*) v SCN novorozených mláďat. O těchto genech je známo, že již v této fázi vývoje vykazují měřitelný rytmus v expresi⁹⁶. Proto jsme čerstvě zabřezlé potkany samice umístili do podmínek stálého světla, za kterých potkani po dvou týdnech ztrácejí endogenní pohybovou rytmicitatu podobně jako při lézi SCN^{123,11} a které také trvale potlačují syntézu melatoninu v šišince¹²⁴. Oba tyto předpoklady jsme ověřili kontrolními měřeními. Za takových podmínek by samice

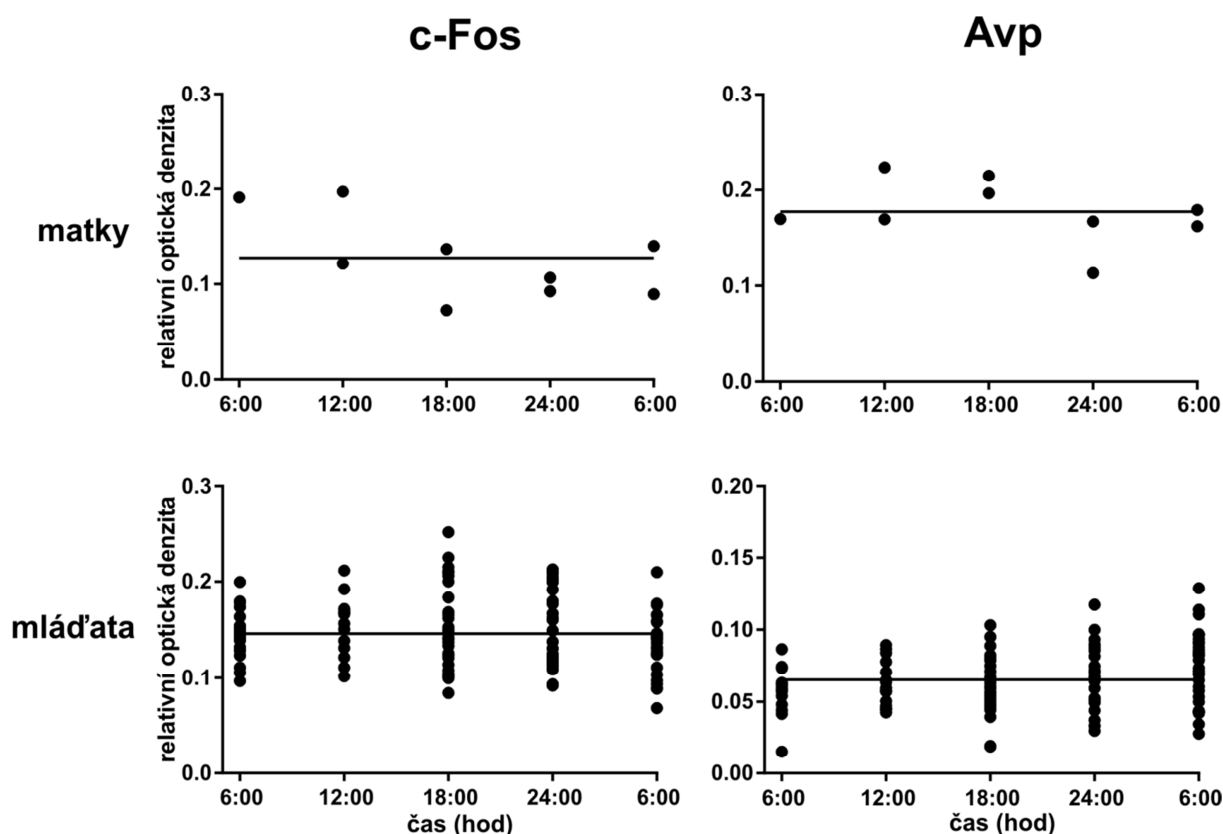
měly porodit mláďata, která nejeví žádnou vzájemnou synchronicitu¹¹¹. Že se tak děje i v našich podmínkách, jsme prověřili kontrolním 24hodinovým profilem novorozených mláďat o 5 časových bodech po 6 hodinách. Hlavičky mláďat i mozek jejich matky jsme uchovali hluboce zmražené pro další zpracování. Další takto připravené březí samice jsme rozdělili do dvou skupin. Obě skupiny dostávaly posledních 5 dní před porodem (E17-E21) v 17:00 pravidelnou intraperitoneální injekci, jedna skupina melatoninu (ve farmakologické dávce) a druhá pouhého vehikula. Po porodu jsme z jedno- až dvoudenních mláďat obou skupin sestavili 24hodinové profily o 9 časových bodech po 3 hodinách a uchovali jejich hlavičky a vzorky jater hluboce zmražené pro další zpracování. Třetí sadu profilů z novorozených mláďat jsme ve stejném experimentálním schematu sesbírali s využitím pinealektomovaných matek, tedy samic, jimž byla dlouho před zabřeznutím chirurgicky vyňata šišinka. Po celou dobu experimentu jsme také kontrolovali pohybovou aktivitu březích samic pomocí infračerveného pohybového čidla. Ze zmražených hlaviček (i mozků samic z kontrolního experimentu) byly připraveny tkáňové řezy a exprese genů v SCN byla stanovena metodou hybridizace *in situ* (laserová mikrodisekce v době přípravy dat nebyla k dispozici). Ze vzorků jater byla postupem s využitím komerčního kitu izolována RNA, dále reverzně transkribována a následně byla změřena genová exprese pomocí kvantitativní PCR. Získaná data jsme statisticky vyhodnotili kosinorovou analýzou.



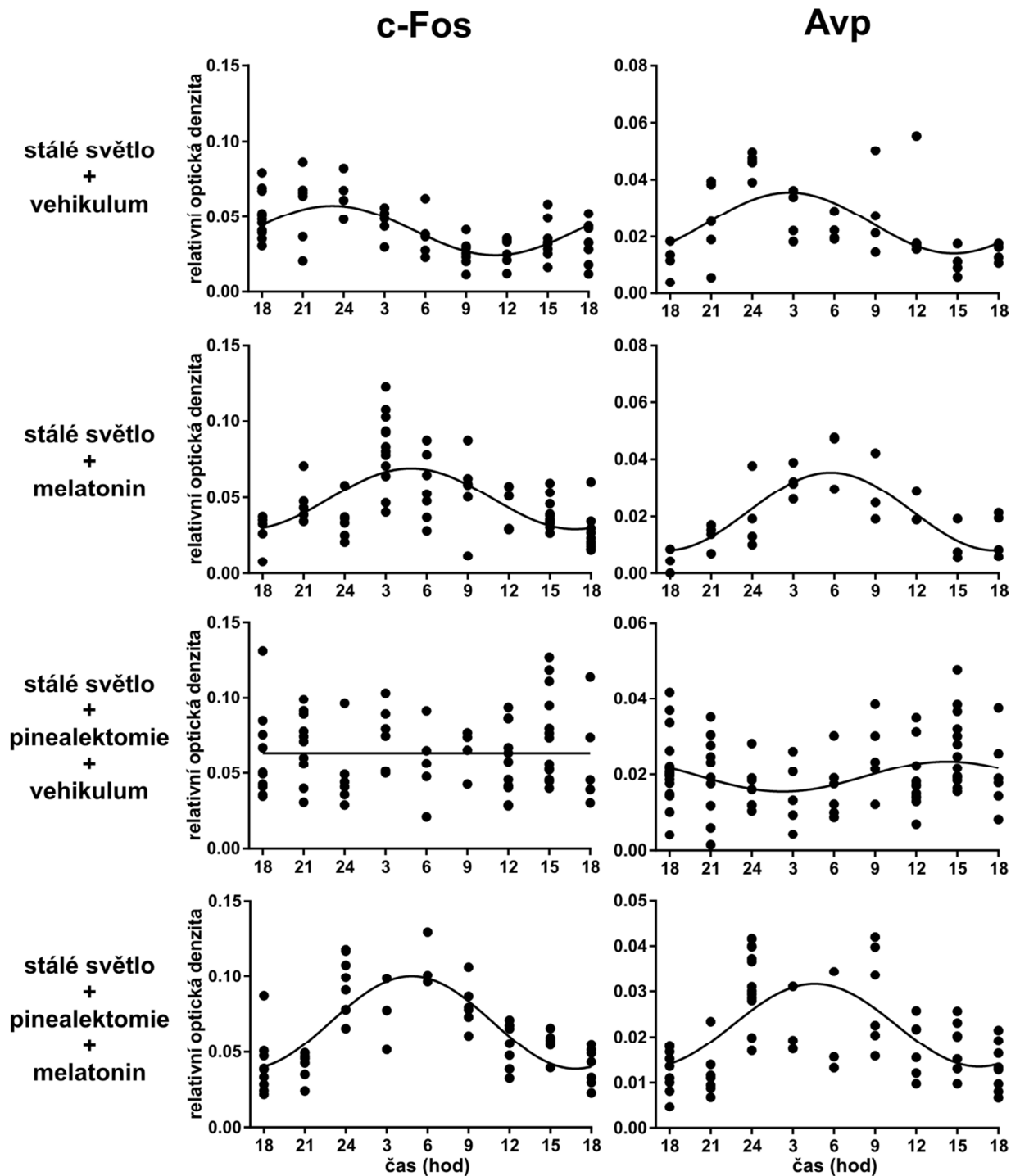
Obr. 7 Dvojitý záznam pohybové aktivity březí samice v průběhu experimentu. Každý řádek představuje dva dny záznamu. V den E0 byla zabřeznutá samice vypuštěna do stálého světla. Hvězdičkou je vyznačeno podání (vehikulové) injekce. Tento záznam představuje příklad samice, která na podání injekce reagovala zvýšenou pohybovou aktivitou po dobu 2 hodin.

Výchozí myšlenkou našich experimentů bylo, že březí samice v podmínkách stálého osvětlení nebudou s to přivést na svět vrh synchronizovaných mláďat. Sledovali jsme proto jejich pohybovou aktivitu a ukázalo se, že březí zvířata reagovala zcela obvyklým způsobem¹²⁵: nejprve jejich aktivita ubíhala s rytmem o výrazně prodloužené periodě a přibližně po dvou týdnech se zcela fragmentovala v několikahodinových nepravidelných cyklech (ukázkový záznam pohybové aktivity lze najít na obr. 7). Podobně kontrolní profil mateřských SCN ukázal nerytmickou expresi hodinami kontrolovaných genů *c-Fos* a *Avp* (obr. 8). Literatura potvrzuje, že za stálého světla jsou jednotlivé neurony SCN vzájemně desynchronizovány¹²⁶ a proto nemohou vytvořit rytmus v genové expresi ani vysílat jednoznačný a robustní synchronizační signál do ostatních částí těla. Stejnětak melatoninový signál je za těchto podmínek potlačen¹²⁴ a nepřináší k vyvíjejícím se plodům žádnou časovou informaci. Důkazem, že v takto uspořádaném pokusu matka neposkytuje svým potomkům cirkadiánní synchronizaci, nám budiž kontrolní profil mláďat, jejichž exprese genů *c-Fos* a *Avp* zůstala bez rytmu (obr. 8).

Zcela odlišnou situaci lze pozorovat u profilů mláďat, jejichž matkám jsme 5 dní před porodem podávali pravidelnou injekci melatoninu (obr. 9), tedy v době, kdy chování matek již bylo arytimizováno a kdy současně v ontogenezi vznikají neurony SCN a přijímají první signály od matky. Tyto profily vykazují signifikantní rytmus v expresi obou genů s akrofází shodně načasovanou těsně před počátek subjektivního dne. Melatonin jsme březím samicím podávali v podvečer, tedy v době, kdy přirozeně nastupuje melatoninový signál, a je proto zajímavé porovnat expresi našich pokusných mláďat s expresí mláďat měřenou za fyziologických podmínek publikovanou v literatuře dříve¹²⁵. V takovém srovnání se ukazuje,



Obr. 8 Exprese hodinami kontrolovaných genů *c-Fos* a *Avp* v SCN potkaních matek, které byly po celou dobu březosti vystaveny stálému světlu, a jejich jedno- až dvoudenních mláďat. 24hodinový profil začíná v 6 hodin ráno a končí v 6 hodin ráno následujícího dne. Kosinorová analýza všech profilů označila za nerytmické.

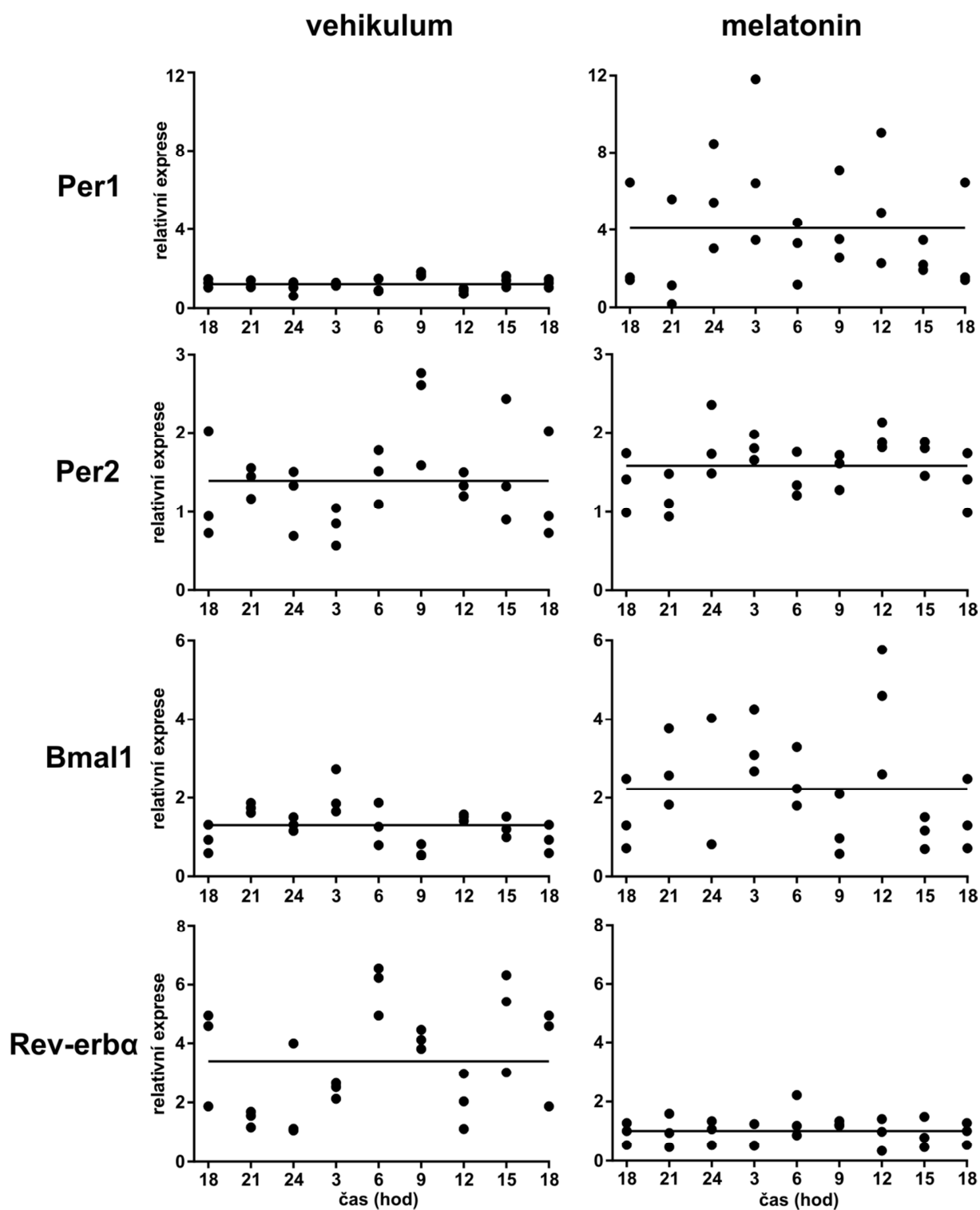


Obr. 9 Expres hodiny kontrolovaných genů c-Fos a Avp v SCN jedno- až dvoudenních mláďat, jejichž matky byly po dobu březosti vystaveny stálému světlu. Další experimentální podmínky jsou shrnuty po levé straně. 24hodinové profily začínají v 18 hodin večer a končí v 18 hodin následujícího dne. Signifikantně rytmické profily stanovené kosinorovou analýzou jsou vyznačeny sinusovou křivkou. V případě intaktních matek analýza našla signifikantní rozdíl mezi akrofázemi exprese obou genů mezi vehikulovou a melatoninovou skupinou. Podobně u pinealektomovaných matek analýza prokázala signifikantní posun fáze v expresi Avp mezi vehikulovým a melatoninovým profilem.

že oboje profily jsou v přibližné fázové shodě, přičemž akrofáze rytmy v expresi *c-Fos* a *Avp* mlád'at matek chovaných na standardním světelném režimu přichází o 3-4 hodiny později než v případě našeho experimentu. Tento rozdíl by bylo možné vysvětlit například tím, že samice chované v režimu 12 hodin světla + 12 hodin tmy mohly svým embryím poskytnout delší melatoninový signál, než samice na stálém světle, které dostaly jedinou dávku melatoninu na počátku subjektivní noci (přičemž je známo, že melatonin se z krevního oběhu rychle odbourává na 6-sulfatoxymelatonin¹²⁷). Rovněž je pozoruhodné, že v obou lehce odlišných modelových situacích (buďto intaktní nebo pinealektomované samice na stálém světle) dopadly výsledky experimentu shodně: exprese obou genů byla signifikantně synchronizována s akrofází kolem 5. hodiny ranní. To vše dohromady potvrzuje, že melatoninový signál podaný embryím v nepřítomnosti jakéhokoli jiného rytmického signálu synchronizoval jejich fetální hodiny v SCN, a to až na úrovni exprese genů *c-Fos* a *Avp*.

Zatímco účinek melatoninu jsme na základě dosavadních vědeckých poznatků mohli očekávat, synchronizační účinek samotného vehikula (fyziologický roztok s 2% přídatkem etanolu) byl poněkud překvapivý už proto, že možnost synchronizovat pohybovou aktivitu dospělých potkanů pouhou procedurou injekčního podání byla experimentálně vyvrácena¹²⁸. Z výsledků našeho pokusu, kdy byl synchronizován profil mlád'at intaktních matek v expresi obou sledovaných genů, však vyplývá, že v případě březích samic je tomu jinak. Z literatury víme, že pokud by chování matek vykazovalo výraznou rytmicitu, mělo by to dopad i na fetální SCN, to jsme ale u našich pokusných zvířat nepozorovali. Ani periodogramy vyhodnocené χ^2 testem neodhalily v jejich chování rytmus pod žádnou periodou. V případě 2 z celkových 8 vehikulových samic (a také 3 z 9 u samic injikovaných melatoninem) bylo možné pozorovat ponejvíce dvouhodinovou zvýšenou aktivitu bezprostředně po podání injekce, ale to samo o sobě k vysvětlení rytmicity nepostačuje. Provedli jsme tedy test vlivu vehikula na hladinu kortikosteronu 30 minut po injekčním podání březí samici držené na stálém světle a ukázalo se, že pouze 2 z 5 testovaných samic měly hladinu tohoto stresového hormonu zvýšenu. Z toho lze usuzovat, že některé ze samic v našem pokusu, ne však všechny, mohly být pouhým kontrolním podáním vehikulové injekce ovlivněny. Jakým mechanismem by se pak mohl behaviorální stav matky přenést až na úroveň cirkadiánní rytmicity embryonálních hodin, není jasné. Spekulovat bychom mohli například o prostřednictví serotoninu, který má svoje receptory v dospělých SCN¹²⁹ a změny v jeho hladině u březích samic potkana má dopady až na expresi *Vip* v SCN jejích plodů¹³⁰, nebo o nějakém jiném neznámém mechanismu. S podobným účinkem injekčního podání březí samici se můžeme setkat také ve výše popsáném pokusu na křečcích zlatých¹²¹. Podstatné však je si povšimnout, že ať už profil mlád'at intaktních samic synchronizovalo podání vehikula jakkoliv, synchronizovalo jej to v signifikantně odlišné fázi oproti injekcím melatoninu. Pravidelné injekce vehikula načasovaly rytmus genové exprese jednou na 23 hodin, jednou na 3 hodiny v noci a v případě pinealektomovaných samic dokonce s velmi slabou amplitudou na 14 hodin, nebo v případě genu *c-Fos* vůbec ne. Na druhé straně melatonin sesynchronizoval genovou expresi vždy shodně na 5-6 hodin ráno a jeho vliv je tak podstatně silnější a fyziologicky má vyšší relevanci. Při pohledu na to, o kolik slabší účinek vehikula je u pinealektomovaných samic, by nebylo bez zajímavosti zjistit, zda se zvířatům kupříkladu po dané operaci významně nezvýšil práh bolestivosti.

Výsledky ze zkoumání exprese hodinových genů v játrech novorozených mlád'at intaktních samic odhalily všechny čtyři zkoumané geny jako nerytmické, a to u obou experimentálních skupin (obr. 10). Uvažovat o možném synchronizačním vlivu mateřského melatoninového signálu nebylo neopodstatněné, protože melatoninové receptory v jaterní tkáni nalezeny byly¹³¹ a rytmus v expresi genu *Rev-erba* byl zachycen již v játrech dvoudenních potkaních mlád'at¹³². Z našeho měření však vyplývá, že pobyt březích samic na stálém světle stačil tento rytmus v periferní tkáni embryí a posléze mlád'at potlačit a melatoninový signál



Obr. 10 Expresa hodinových genů Per1, Per2, Bmal1 a Rev-erba v játrech jedno- až dvoudenních mláďat intaktních matek chovaných po dobu březosti na stálém světle, kterým bylo podáváno vehikulum (vlevo), nebo melatonin (vpravo). 24hodinové profily začínají v 18 hodin večer a pokračují do 18 hodin následujícího dne. Kosinorová analýza všechny profily vyhodnotila jako nerytmické.

nedokázal účinek světla zvrátit. Zde je patrné, že regulační mechanismy pro jednotlivé periferní tkáně se liší už v tak útlém věku, neboť v případě mláděcích nadledvinek byla schopnost prenatálně podávaného melatoninu zvrátit negativní účinky stálého světla prokázána¹³³.

Závěr

Jak již měl čtenář příležitost nahlédnout, mateřská cirkadiánní synchronizace fetálních oscilátorů je komplexní a redundantní systém, kde je jedna složka kdykoliv připravená nahradit jinou, vyřazenou. Příroda nám tak jeho studium nijak neusnadňuje. Přesto věřím, že se nám podařilo podat přesvědčivý důkaz o tom, že melatonin vedle dalších složek hraje v tomto systému důležitou úlohu a že je podstatně silnějším synchronizátorem fetálních SCN než pouhé vehikulum. V naší pozdější práci, kterou jsem ale kvůli lepší posloupnosti výkladu předřadil, jsme ukázali, že prvním hodinovým genem, jehož exprese začíná v průběhu vývoje fetálních SCN rytmovat, je gen *Rev-erba* a ostatní hodinové geny se připojují teprve později - avšak dříve, než se nové potkaní mládě narodí. V této souvislosti může jen autor zalitovat, že se pořadí objevů neodehrálo v opačném gardu, neboť se znalostí role *Rev-erba* by bylo jistě zajímavé prostudovat účinek mateřského melatoninu na jeho rytmicitu.

Citované publikace

- 1 Petrásek T**, Prokopová I, Sládek M, Weissová K, Vojtěchová I, Bahník S, Zemanová A, Schöning K, Berger S, Tews B, Bartsch D, Schwab ME, Sumová A, Stuchlík A. Nogo-A-deficient Transgenic Rats Show Deficits in Higher Cognitive Functions, Decreased Anxiety, and Altered Circadian Activity Patterns. *Front Behav Neurosci.* **2014** Mar 18;8:90.
- 2 DeCoursey PJ**. Function of response rhythm in hamsters. *J Cell Comp Physiol.* **1964** Apr;63:189-96.
- 3 Mistlberger RE**, Antle MC, Webb IC, Jones M, Weinberg J, Pollock MS. Circadian clock resetting by arousal in Syrian hamsters: the role of stress and activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2003** Oct;285(4):R917-25.
- 4 Reebs SG**, Mrosovsky N. Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve. *J Biol Rhythms.* **1989** Spring;4(1):39-48.
- 5 Krieger DT**. Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology.* **1974** Nov;95(5):1195-201.
- 6 Mrosovsky N**. Phase response curves for social entrainment. *J Comp Physiol A.* **1988** Jan;162(1):35-46.
- 7 Antle MC**, Steen NM, Mistlberger RE. Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster. *Neuroreport.* **2001** Sep 17;12(13):2901-5.
- 8 Ralph MR**, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science.* **1990** Feb 23;247(4945):975-8.
- 9 Schwartz WJ**, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res.* **1983** Sep 5;274(1):184-7.
- 10 Gillette MU**, Reppert SM. The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res Bull.* **1987** Jul;19(1):135-9.
- 11 Stephan FK**, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1972** Jun;69(6):1583-6.
- 12 Hamada T**, LeSauter J, Venuti JM, Silver R. Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J Neurosci.* **2001** Oct 1;21(19):7742-50.
- 13 Glazer R**, Gozes I. Diurnal oscillation in vasoactive intestinal peptide gene expression independent of environmental light entraining. *Brain Res.* **1994** Apr 25;644(1):164-7.
- 14 Shinohara K**, Isobe Y, Takeuchi J, Inouye ST. Circadian rhythms of somatostatin-immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci Lett.* **1991** Aug 5;129(1):59-62.

- 15 Okamura H, Ibata Y.** GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neurosci Lett.* **1994** Nov 7;181(1-2):165-8.
- 16 Jacobowitz DM, Winsky L.** Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol.* **1991** Feb 8;304(2):198-218.
- 17 van den Pol AN, Tsujimoto KL.** Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience.* **1985** Aug;15(4):1049-86.
- 18 Moore RY, Speh JC.** GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett.* **1993** Feb 5;150(1):112-6.
- 19 Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM.** Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron.* **1995** Apr;14(4):697-706.
- 20 Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA.** Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol.* **2010**;72:551-77.
- 21 Castel M, Belenky M, Cohen S, Ottersen OP, Storm-Mathisen J.** Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* **1993** Apr 1;5(4):368-81.
- 22 Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD.** Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci.* **1997** Apr 1;17(7):2637-44.
- 23 Harrington ME, Nance DM, Rusak B.** Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Res Bull.* **1985** Nov;15(5):465-72.
- 24 Morin LP, Blanchard J.** Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis Neurosci.* **1995** Jan-Feb;12(1):57-67.
- 25 Azmitia EC, Segal M.** An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* **1978** Jun 1;179(3):641-67.
- 26 Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM.** A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int.* **2006**;23(3):521-35.
- 27 Kalsbeek A, Scheer FA, Perreau-Lenz S, La Fleur SE, Yi CX, Fliers E, Buijs RM.** Circadian disruption and SCN control of energy metabolism. *FEBS Lett.* **2011** May 20;585(10):1412-26.
- 28 Buijs RM, la Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K, Nijima A.** The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and

parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* **2003** Sep 8;464(1):36-48.

29 Tousson E1, Meissl H. Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* **2004** Mar 24;24(12):2983-8.

30 Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, Weitz CJ. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science.* **2001** Dec 21;294(5551):2511-5.

31 Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature.* **2002** May 23;417(6887):405-10.

32 Kraves S, Weitz CJ. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci.* **2006** Feb;9(2):212-9.

33 Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science.* **1994** Apr 29;264(5159):719-25.

34 Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron.* **2001** May;30(2):525-36.

35 van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature.* **1999** Apr 15;398(6728):627-30.

36 Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y. Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, *Arnt3*, with HIF-1 α , HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998** Jul 30;248(3):789-94.

37 Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the *CLOCK* protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* **1998** Jun 5;280(5369):1564-9.

38 Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, Fruechte EM, Vitaterna MH, Shimomura K, King DP, Young MW, Weitz CJ, Takahashi JS. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and *mPer1* interact and negatively regulate *CLOCK*-*BMAL1*-induced transcription. *Neuron.* **1998** Nov;21(5):1101-13.

39 Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell.* **1999** Jul 23;98(2):193-205.

40 Triqueneaux G, Thenot S, Kakizawa T, Antoch MP, Safi R, Takahashi JS, Delaunay F, Laudet V. The orphan receptor *Rev-erb α* gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol.* **2004** Dec;33(3):585-608.

- 41 Sato TK**, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. **2004** Aug 19;43(4):527-37.
- 42 Preitner N**, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. **2002** Jul 26;110(2):251-60.
- 43 Gatfield D**, Schibler U. Proteasomes keep the circadian clock ticking. *Science*. **2007** May 25;316(5828):1135-6.
- 44 Hirayama J**, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*. **2007** Dec 13;450(7172):1086-90.
- 45 Cheng HY**, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, Nakazawa T, Shimizu K, Okamura H, Impey S, Obrietan K. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*. **2007** Jun 7;54(5):813-29.
- 46 Reppert SM**, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. **2001**;63:647-76.
- 47 Yamazaki S**, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. **2000** Apr 28;288(5466):682-5.
- 48 Wang LM**, Dragich JM, Kudo T, Odom IH, Welsh DK, O'Dell TJ, Colwell CS. Expression of the circadian clock gene *Period2* in the hippocampus: possible implications for synaptic plasticity and learned behaviour. *ASN Neuro*. **2009** Jun 10;1(3).
- 49 Yoo SH**, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkas SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004** Apr 13;101(15):5339-46.
- 50 Sakamoto K**, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N. Multitissue circadian expression of rat period homolog (*rPer2*) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*. **1998** Oct 16;273(42):27039-42.
- 51 Brown SA**, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol*. **2002** Sep 17;12(18):1574-83.
- 52 Schibler U**, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*. **2003** Jun;18(3):250-60.
- 53 Akhtar RA**, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, Kyriacou CP. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by

cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol*. **2002** Apr 2;12(7):540-50.

54 Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*. **2002** May 2;417(6884):78-83.

55 Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*. **2008** Oct;9(10):764-75.

56 Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*. **2010** Dec 3;330(6009):1349-54.

57 Fritschi L, Glass DC, Heyworth JS, Aronson K, Girschik J, Boyle T, Grundy A, Erren TC. Hypotheses for mechanisms linking shiftwork and cancer. *Med Hypotheses*. **2011** Sep;77(3):430-6.

58 Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem*. **2007** Feb 16;282(7):4233-7.

59 Illnerová H, Vaněček J, Křeček J, Wetterberg L, Sääf J. Effect of one minute exposure to light at night on rat pineal serotonin N-acetyltransferase and melatonin. *J Neurochem*. **1979** Feb;32(2):673-5.

60 Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*. **1999** Apr 5;406(2):171-82.

61 Deguchi T, Axelrod J. Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta--adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1972** Sep;69(9):2547-50.

62 Vaněček J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*. **1985** Jun;116(6):2167-73.

63 Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. **1994** Nov;13(5):1177-85.

64 Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995** Sep 12;92(19):8734-8.

65 Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci*. **2004** Mar 19;74(18):2227-36.

66 Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppäluoto J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci*. **2005** Jan 21;76(10):1123-34.

- 67 Clemens JW**, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci.* **2001** May 25;69(1):27-35.
- 68 Frungieri MB**, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI. Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology.* **2005** Mar;146(3):1541-52.
- 69 Richter HG**, Torres-Farfan C, Garcia-Sesnich J, Abarzua-Catalan L, Henriquez MG, Alvarez-Felmer M, Gaete F, Rehren GE, Seron-Ferre M. Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology.* **2008** Mar;149(3):995-1003.
- 70 Pozo D**, Delgado M, Fernandez-Santos JM, Calvo JR, Gomariz RP, Martin-Lacave I, Ortiz GG, Guerrero JM. Expression of the Mel1a-melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. *FASEB J.* **1997** May;11(6):466-73.
- 71 Liu C**, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* **1997** Jul;19(1):91-102.
- 72 Waly NE**, Hallworth R. Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J Circadian Rhythms.* **2015** Mar 10;13:1.
- 73 Klosen P**, Bienvenu C, Demarteau O, Dardente H, Guerrero H, Pévet P, Masson-Pévet M. The mt1 melatonin receptor and RORbeta receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *J Histochem Cytochem.* **2002** Dec;50(12):1647-57.
- 74 Musshoff U**, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus.* **2002**;12(2):165-73.
- 75 Niles LP**, Hashemi F. Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus. *Cell Mol Neurobiol.* **1990** Dec;10(4):553-8.
- 76 Morgan PJ**, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int.* **1994** Feb;24(2):101-46.
- 77 Ho MK**, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS, Wong YH. Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Br J Pharmacol.* **2001** Apr;132(7):1431-40.
- 78 Bothorel B**, Barassin S, Saboureaux M, Perreau S, Vivien-Roels B, Malan A, Pévet P. In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur J Neurosci.* **2002** Sep;16(6):1090-8.
- 79 Redman J**, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science.* **1983** Mar 4;219(4588):1089-91.

- 80 Agez L, Laurent V, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F.** Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. **2007** Jan 19;144(2):522-30.
- 81 Zisapel N.** Circadian rhythm sleep disorders: pathophysiology and potential approaches to management. *CNS Drugs*. **2001**;15(4):311-28.
- 82 Arendt J, Skene DJ.** Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. **2005** Feb;9(1):25-39.
- 83 Kováčiková Z, Sládek M, Bendová Z, Illnerová H, Sumová A.** Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *J Biol Rhythms*. **2006** Apr;21(2):140-8.
- 84 Hiroshige T, Honma K, Watanabe K.** Prenatal onset and maternal modifications of the circadian rhythm of plasma corticosterone in blind infantile rats. *J Physiol*. **1982** Apr;325:521-32.
- 85 Smith GK, Anderson V.** Effects of maternal isolation on the development of activity rhythms in infant rats. *Physiol Behav*. **1984** Nov;33(5):751-6.
- 86 Weinert D.** Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Chronobiol Int*. **2005**;22(2):179-205.
- 87 Moore RY.** Development of the suprachiasmatic nucleus. In: Klein, DC, Moore RY, Reppert SM, eds. *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford Univ. Press, **1991**, pp. 391–404.
- 88 Nishide SY, Honma S, Honma K.** The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation. *Eur J Neurosci*. **2008** May;27(10):2686-90.
- 89 Sládek M, Sumová A, Kováčiková Z, Bendová Z, Laurinová K, Illnerová H.** Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2004** Apr 20;101(16):6231-6.
- 90 Matějů K, Bendová Z, El-Hennamy R, Sládek M, Sosniyenko S, Sumová A.** Development of the light sensitivity of the clock genes *Period1* and *Period2*, and immediate-early gene *c-fos* within the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. **2009** Feb;29(3):490-501.
- 91 Reppert SM, Schwartz WJ.** The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using ¹⁴C-labeled deoxyglucose. *J Neurosci*. **1984** Jul;4(7):1677-82.
- 92 Shibata S, Moore RY.** Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. **1987** Aug;431(2):311-5.
- 93 Reppert SM, Uhl GR.** Vasopressin messenger ribonucleic acid in supraoptic and suprachiasmatic nuclei: appearance and circadian regulation during development. *Endocrinology*. **1987** Jun;120(6):2483-7.

- 94 Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K.** Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci.* **2002** Jun;15(12):1953-60.
- 95 Davis FC, Gorski RA.** Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol A.* **1988** Apr;162(5):601-10.
- 96 El-Hennamy R, Matějů K, Bendová Z, Sosniyenko S, Sumová A.** Maternal control of the fetal and neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* **2008** Oct;23(5):435-44.
- 97 Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Takumi T.** Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol.* **2004** Oct 9;5:18.
- 98 Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najib J, Laudet V, Staels B.** Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol Endocrinol.* **1999** Mar;13(3):400-9.
- 99 Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szewergold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB, Lazar MA.** Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science.* **2007** Dec 14;318(5857):1786-9.
- 100 Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP, Rastinejad F.** Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta. *Nat Struct Mol Biol.* **2007** Dec;14(12):1207-13.
- 101 Adelmant G, Bègue A, Stéhelin D, Laudet V.** A functional Rev-erb alpha responsive element located in the human Rev-erb alpha promoter mediates a repressing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996** Apr 16;93(8):3553-8.
- 102 Goodwin BC.** Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Adv Enzyme Regul.* **1965**;3:425-38.
- 103 Kornhauser JM, Mayo KM, Takahashi JS.** Immediate-early gene expression in a mammalian circadian pacemaker: The suprachiasmatic nucleus. In: Youngs MW, editor. *Molecular Genetics of Biochemical Rhythms.* Dekker, New York. **1993**, 271–307.
- 104 Iwasaki Y, Oiso Y, Saito H, Majzoub JA.** Positive and negative regulation of the rat vasopressin gene promoter. *Endocrinology.* **1997** Dec;138(12):5266-74.
- 105 Hill JM, Agoston DV, Gressens P, McCune SK.** Distribution of VIP mRNA and two distinct VIP binding sites in the developing rat brain: relation to ontogenic events. *J Comp Neurol.* **1994** Apr 8;342(2):186-205.
- 106 Rea MA.** VIP-stimulated cyclic AMP accumulation in the suprachiasmatic hypothalamus. *Brain Res Bull.* **1990** Dec;25(6):843-7.

- 107 Gonzalez GA, Montminy MR.** Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. **1989** Nov 17;59(4):675-80.
- 108 Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM.** A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*. **1999** Jan 8;96(1):57-68.
- 109 Reppert SM, Schwartz WJ.** Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J Neurosci*. **1986** Sep;6(9):2724-9.
- 110 Jud C, Albrecht U.** Circadian rhythms in murine pups develop in absence of a functional maternal circadian clock. *J Biol Rhythms*. **2006** Apr;21(2):149-54.
- 111 Shibata S, Moore RY.** Development of a fetal circadian rhythm after disruption of the maternal circadian system. *Brain Res*. **1988** Jun 1;469(1-2):313-7.
- 112 Weaver DR, Reppert SM.** Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Brain Res Dev Brain Res*. **1989** Apr 1;46(2):291-6.
- 113 Viswanathan N, Davis FC.** Single prenatal injections of melatonin or the D1-dopamine receptor agonist SKF 38393 to pregnant hamsters sets the offsprings' circadian rhythms to phases 180 degrees apart. *J Comp Physiol A*. **1997** Apr;180(4):339-46.
- 114 Reppert SM, Chez RA, Anderson A, Klein DC.** Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr Res*. **1979** Jun;13(6):788-91.
- 115 Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC.** A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology*. **1979** Feb;104(2):295-301.
- 116 Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG.** Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science*. **1988** Oct 7;242(4875):78-81.
- 117 Williams LM, Martinoli MG, Titchener LT, Pelletier G.** The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. *Endocrinology*. **1991** Apr;128(4):2083-90.
- 118 Reppert SM, Schwartz WJ.** Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinology*. **1986** Oct;119(4):1763-7.
- 119 Bellavía SL, Carpentieri AR, Vaqué AM, Macchione AF, Vermouth NT.** Pup circadian rhythm entrainment effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav*. **2006** Oct 30;89(3):342-9.
- 120 Torres-Farfan C, Rocco V, Monsó C, Valenzuela FJ, Campino C, Germain A, Torrealba F, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M.** Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology*. **2006** Oct;147(10):4618-26.
- 121 Davis FC, Mannion J.** Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. *Am J Physiol*. **1988** Sep;255(3 Pt 2):R439-48.

- 122 Grosse J, Davis FC.** Melatonin entrains the restored circadian activity rhythms of syrian hamsters bearing fetal suprachiasmatic nucleus grafts. *J Neurosci.* **1998** Oct 1;18(19):8032-7.
- 123 Pittendrigh CS, Daan S.** A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *J. Comp. Physiol,* **1976**, A 106 , 333–355
- 124 Vaněček J, Koliňová M, Illnerová H.** The effect of constant light on the circadian pacemaker driving pineal N-acetyl transferase and drinking rhythms in rats. In: Trentini GP, De Gaetani C, Pevet P, editors. *Fundamentals and Clinics in Pineal Research. Sereno Symposia* 44. New York: Raven Press, **1987**. pp 191–194.
- 125 Nováková M, Sládek M, Sumová A.** Exposure of pregnant rats to restricted feeding schedule synchronizes the SCN clocks of their fetuses under constant light but not under a light-dark regime. *J Biol Rhythms.* **2010** Oct;25(5):350-60.
- 126 Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG.** Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.* **2005** Mar;8(3):267-9.
- 127 Francis PL, Leone AM, Young IM, et al.** Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. *Clin Chem* **1987**; 33 :453–7.
- 128 Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM.** Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav.* **1986**;36(6):1111-21.
- 129 Roca AL, Weaver DR, Reppert SM.** Serotonin receptor gene expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* **1993** Apr 9;608(1):159-65.
- 130 Ugrumov MV, Trembleau A, Calas A.** Altered vasoactive intestinal polypeptide gene expression in the fetal rat suprachiasmatic nucleus following prenatal serotonin deficiency. *Int J Dev Neurosci.* **1994** Apr;12(2):143-9.
- 131 Venegas C, García JA, Doerrier C, Volt H, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D.** Analysis of the daily changes of melatonin receptors in the rat liver. *J Pineal Res.* **2013** Apr;54(3):313-21.
- 132 Sládek M, Jindráková Z, Bendová Z, Sumová A.** Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2007** Mar;292(3):R1224-9.
- 133 Mendez N, Abarzua-Catalan L, Vilches N, Galdames HA, Spichiger C, Richter HG, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M, Torres-Farfan C.** Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. *PLoS One.* **2012**;7(8):e42713.
- 134 Paxinos G, Watson C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier Academic Press, **2005**, Burnlington, USA
- 135 Ko CH, Takahashi JS.** Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* **2006** Oct 15;15 Spec No 2:R271-7.